

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-192081

(43)公開日 平成11年(1999) 7月21日

(51)Int.Cl.⁸

識別記号

F I

C 1 2 N 1/00

C 1 2 N 1/00

F

A 6 1 L 15/16

A 6 1 L 27/00

C

27/00

15/01

審査請求 未請求 請求項の数9 F D (全 6 頁)

(21)出願番号

特願平9-368823

(22)出願日

平成9年(1997)12月27日

(71)出願人 000138082

株式会社メニコン

愛知県名古屋市中区葵3丁目21番19号

(72)発明者 柳川 博昭

愛知県春日井市高森台5丁目1番地10 株
式会社メニコン内

(72)発明者 杉山 章寿

愛知県春日井市高森台5丁目1番地10 株
式会社メニコン内

(72)発明者 杉江 稔正

愛知県春日井市高森台5丁目1番地10 株
式会社メニコン内

(74)代理人 弁理士 岡田 英彦 (外6名)

(54)【発明の名称】 コラーゲン成形体及びコラーゲン成形体の作製法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】新規なコラーゲン成形体の作製法を提供する。

【解決手段】コラーゲン溶液中のコラーゲン以外の溶質組成をコラーゲンがゲル化可能な状態に平衡化してコラーゲンをゲル化することを経てコラーゲン成形体を作製する。コラーゲン溶液をコラーゲンを通さないが他の溶質を通すことのできる半透膜を介して生理的塩類溶液と接触させることにより該生理的塩類溶液に平衡化してゲル化することが好ましい。

【効果】コラーゲン溶液中の本溶質組成を生理的塩類溶液に平衡化しながらゲル化すると、生理的塩類条件下で均質にゲル化されたコラーゲングルが得られる。このため、生理的塩類溶液中に接触しても、収縮したりひずんだりすることがないコラーゲン成形体を得られる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コラーゲン溶液中のコラーゲン以外の溶質組成をコラーゲンがゲル化可能な状態に平衡化してコラーゲンをゲル化することを経てコラーゲン成形体を作製する方法。

【請求項2】 コラーゲン溶液をコラーゲンを通さないが他の溶質を通すことのできる半透膜を介して生理的塩類溶液と接触させることにより該生理的塩類溶液に平衡化してゲル化する請求項1記載のコラーゲン成形体の作製法。

【請求項3】 コラーゲン溶液をコラーゲン溶液の表面をゲル化して得たコラーゲングル膜を介して生理的塩類溶液と接触させることにより該生理的塩類溶液に平衡化してゲル化する請求項1記載のコラーゲン成形体の作製法。

【請求項4】 コラーゲン溶液を、コラーゲン溶液中のコラーゲン以外の溶質組成をコラーゲンがゲル化可能な状態に平衡化してコラーゲンをゲル化することを経て得られるコラーゲン成形体。

【請求項5】 コラーゲン溶液をコラーゲンを通さないが他の溶質を通すことのできる半透膜を介して生理的塩類溶液と接触させることにより、コラーゲン溶液中のコラーゲン以外の溶質組成を該生理的塩類溶液に平衡化してゲル化することを経て得られるコラーゲン成形体。

【請求項6】 コラーゲン溶液をコラーゲン溶液の表面をゲル化して得たコラーゲングル膜を介して生理的塩類溶液と接触させることにより、該生理的塩類溶液に平衡化してゲル化することを経て得られるコラーゲン成形体。

【請求項7】 生理的塩類溶液に浸漬後の成形体の面積保持率が85%以上である請求項4ないし6記載のコラーゲン成形体。

【請求項8】 細胞培養基材、培養皮膚基材あるいは創傷被覆材のいずれかである請求項4ないし7記載のコラーゲン成形体。

【請求項9】 請求項4ないし7記載のコラーゲン成形体を培養基材とする培養皮膚。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、コラーゲン成形体の作製法に関する。詳しくは、細胞又は組織を培養するための基材、熱傷、創傷、褥瘡または皮膚潰瘍などの皮膚欠損創に用いて、表皮及び表皮を含む欠損組織を早期に再建させたり、あるいは、治療するために用いる培養皮膚に用いられるコラーゲン成形体に関する。

【0002】

【従来の技術】 コラーゲンの成形体は、近年、細胞培養基材や、培養皮膚等のインプラント基材として用いられるようになってきている。コラーゲン成形体は、低抗原性で生体適合性が良好で、しかも物理的強度も良好であり、前記した用途に適した素材として注目されている。

かかるコラーゲン成形体のうち、スポンジ状の成形体が広い用途に適した材料として製造されることが多い。かかるスポンジ状の成形体は、通常、次のような方法で作製されている。第1の方法は、コラーゲンの酸性溶液を調製し、このコラーゲン溶液をアンモニア雰囲気中でゲル化させた後、必要に応じて系内に存在するアンモニウム塩を水洗除去し、その後、凍結し、乾燥させてスポンジ状体とし、さらにUV照射により架橋を施す方法である。第2の方法は、ゲル化工程を、コラーゲン酸性溶液をリン酸緩衝食塩液等の中性溶液及び／又は塩基性溶液と直接混合することによりゲル化することにより行い、その他は第1の方法と同様に行う方法である。第3の方法は、ゲル化工程を、リン酸緩衝食塩液等の中性溶媒を用いて低温で中性のコラーゲン溶液を調製し、これを加温してゲル化することにより行い、その他は第1の方法と同様に行う方法である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、第1の方法によって得られたコラーゲン成形体は、通常使用される生理的条件下では、その使用過程において徐々に収縮することが知られている。収縮による形態変化、及び物理的特性の変化は、安定した細胞培養のみならず、培養皮膚等のインプラントの作製にも不都合を生じている。第2の方法では、コラーゲン酸性溶液に対して添加する中性溶媒及び／又は塩基性溶媒との混合により、ゲル化に適したpHや緩衝能を付与するが、高濃度の酸性コラーゲン溶液を用いてコラーゲン濃度の高いコラーゲングルを作成しようとしても、ゲル化に適したpHや緩衝能を得るためには前記中性溶媒及び／又は塩基性溶媒を多く用いる必要があり、結果として、コラーゲン濃度が低下することになり、所望の濃度のコラーゲングルを得ることが困難である。一方、ゲル化に際してのコラーゲン濃度の低下を小さくするために高濃度の中性溶媒あるいは塩基性溶媒を用いると、コラーゲン酸性溶液の高粘性とあいまって均一なゲル化が困難である。第3の方法では、リン酸緩衝食塩液等の中性溶媒に対するコラーゲンの低温での溶解性が低いために、この方法によっても高濃度のコラーゲングルの作製は困難である。したがって、このような問題を生じない、新規なコラーゲン成形体及びコラーゲン成形体の製造方法が望まれていた。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、コラーゲン溶液をゲル化する際に、コラーゲン酸性溶液を、生理的塩類溶液で平衡化してゲル化すると、コラーゲン濃度の高いゲルを簡易にかつ均質な状態に作製することができ、しかも、この過程を経て作製したコラーゲン成形体を生理的条件下においても顕著な収縮を起こさないことを見だし、本発明を完成するに至った。

【0005】 本発明は、コラーゲン溶液中のコラーゲン以外の溶質組成をコラーゲンがゲル化可能な状態に平衡

化してコラーゲンをゲル化することを経てコラーゲン成形体を作製する方法である。この発明によると、コラーゲン溶液中のコラーゲン以外の溶質組成（以下、本溶質組成という。）が、コラーゲンがゲル化可能な状態に平衡化される。換言すれば、コラーゲン分子を取り巻く本溶質組成が、コラーゲンがゲル化可能な状態に徐々に移行される。このため、均質なコラーゲンゲルが得られる。また、従来のコラーゲンゲルの作製方法では達成されなかった、コラーゲン濃度や電解質条件でのゲル化が可能になり、従来にないコラーゲン濃度や性質を備えるコラーゲンゲルが得られる。かかるコラーゲンゲルはそのままコラーゲン成形体とされ、あるいは、凍結乾燥等されて他の態様のコラーゲン成形体とされる。かかるゲルを経て得られるコラーゲン成形体は、ゲルと同様に、均質であり、従来にないコラーゲン濃度や性質を備えるコラーゲン成形体を得られる。

【0006】この発明において、コラーゲン溶液をコラーゲンを通さないが他の溶質を通すことのできる半透膜（以下、本半透膜という。）を介して生理的塩類溶液と接触させることにより該生理的塩類溶液に平衡化してゲル化することが好ましい形態である。本半透膜を用いることにより、簡易にゲル化可能な状態に平衡化され、また、コラーゲン溶液のコラーゲン濃度を大きく低下させることなくゲル化でき、所望のコラーゲン濃度のゲルが得られる。また、コラーゲン溶液中の本溶質組成を生理的塩類溶液に平衡化しながらゲル化すると、生理的塩類条件下で均質にゲル化されたコラーゲンゲルが得られる。このため、生理的塩類溶液中に接触しても、収縮したりひずんだりすることがないコラーゲン成形体を得られる。

【0007】また、この発明において、コラーゲン溶液をコラーゲン溶液の表面をゲル化して得たコラーゲンゲル膜を介して生理的塩類溶液と接触させることにより該生理的塩類溶液に平衡化してゲル化することも好ましい形態である。コラーゲンゲル膜は、コラーゲンを通すことなく、他の溶質を通すことのできる半透膜であり、本半透膜に含められる。特に、この態様によると、簡易に、平衡化し、ゲル化される。

【0008】本発明は、また、コラーゲン溶液を、コラーゲン溶液中のコラーゲン以外の溶質組成をコラーゲンがゲル化可能な状態に平衡化してコラーゲンをゲル化することを経て得られるコラーゲン成形体である。また、コラーゲン溶液をコラーゲンを通さないが他の溶質を通すことのできる半透膜を介して生理的塩類溶液と接触させることにより、コラーゲン溶液中のコラーゲン以外の溶質組成を該生理的塩類溶液に平衡化してゲル化することを経て得られるコラーゲン成形体である。また、コラーゲン溶液をコラーゲン溶液の表面をゲル化して得たコラーゲンゲル膜を介して生理的塩類溶液と接触させることにより、該生理的塩類溶液に平衡化してゲル化するこ

とを経て得られるコラーゲン成形体である。これらのコラーゲン成形体においては、生理的塩類溶液に浸漬後の成形体の面積保持率が85%以上であることが好ましい態様である。さらに、上記したコラーゲン成形体が、細胞培養基材、培養皮膚基材あるいは創傷被覆材のいずれかであることが好ましい態様である。また、上記したコラーゲン成形体を培養基材とする培養皮膚であることが好ましい態様である。

【0009】

10 【発明の実施の形態】以下、本発明を実施の形態について詳細に説明する。本発明では、コラーゲン溶液をゲル化するのに際して、本溶質組成を、所望のゲル化溶液を用いて、コラーゲンがゲル化可能な状態に平衡化することの特徴とするものである。すなわち、この発明によると、コラーゲンの存在する環境が、コラーゲンを溶解している状態から、所望のゲル化可能状態へと変化される。この結果、所望の条件下でのコラーゲンゲル及びコラーゲン成形体を得ることができるというものである。

20 【0010】（コラーゲン溶液）コラーゲン溶液中には、少なくともコラーゲンを溶質として含有する。コラーゲン溶液を構成するコラーゲンとしては、医療上既に広く利用され、種々のタイプが市販されている。本発明では、これらを特に限定することなく使用することができる。好ましくは、入手が容易であること、変性温度が高いこと等から牛や豚の皮膚や腱などから抽出されたコラーゲンである。さらに、より抗原性を低減させて安全性を高める必要がある場合には、コラーゲンを例えばペプシン等のプロテアーゼ等で処理してテロペプチドをできる限り除去したアテロコラーゲンを用いる。さらに、

30 コラーゲンゲルあるいは成形体の用途に応じて各種型のコラーゲンを適宜使用する。例えば、真皮の機能を培養皮膚に付加するためには真皮の主要構成成分に近いI型、III型を単独であるいは組み合わせて用いることが好ましい。

【0011】コラーゲン溶液は、その液性（pH）を特に問わないで用いることができる。ただし、コラーゲンを高濃度に溶解できる溶媒で溶解したものが好ましい。酸性溶液は、コラーゲンの濃度の高い溶液を調製できる点において好ましい。また、酸性溶液は、中性塩類溶液や生理的塩類溶液に平衡化しながらゲル化するのに都合がよい点でも好ましい。特に、好ましくは、アテロコラーゲンの酸性溶液を用いることができる。コラーゲンの酸性溶液を調製するには、通常、塩酸、クエン酸、乳酸等が用いられるが、特に限定しないでその他の無機酸や有機酸を使用することができる。ただし、得られたコラーゲンゲルあるいは成形体が生体あるいは培養系に対して毒性を示さないことが好ましい。そのpHは、7未満の範囲で適宜選択できるが、コラーゲンの溶解性を考慮すると、好ましくは、5以下、より好ましくは4以下である。また、変性に対する安定性を考慮すると、好まし

くは2以上、より好ましくは3以上である。また、イオン強度に関しては、特に限定するものでなく、本平衡化過程におけるゲル化が完結可能であればよい。コラーゲン濃度は、0.05w/v %以上に調整するのが好ましく、より好ましくは、1w/v %以上である。また、2w/v %以下に調整するのが好ましい。

【0012】なお、コラーゲン溶液には、コラーゲンとともにゲルを構成する他の高分子を含有させることができる。具体的には、生体適合性のある高分子や、生体内吸収性高分子、生体分解性高分子等であり、より具体的には、ゼラチン、ヒアルロン酸、キチン、キトサンやムコ多糖のような糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸等の合成高分子またはこれらの共重合体、ポリメタクリル酸ヒドロキシエチル等の高含水高分子、フィブリンやアルブミン等のタンパク質を混合することができる。

【0013】(コラーゲン溶液中の本溶質組成の平衡化) 本発明において、コラーゲン溶液中の本溶質組成をコラーゲンがゲル化可能状態に平衡化するには、コラーゲン溶液を、コラーゲンを通さないが他の溶質を通すことのできる本半透膜あるいはコラーゲンゲル膜を介してゲル化溶液と接触させることにより平衡化することが好ましい。

【0014】(ゲル化溶液) ゲル化溶液は、本溶質組成を平衡化する過程、あるいは平衡化が完了した状態において、コラーゲン溶液側にコラーゲンがゲル化可能な状態を形成できるものであればよい。すなわち、本溶質組成が完全に平衡化されるまでのいずれかの段階で、コラーゲン溶液側に、pH、イオン強度、その他について、コラーゲンがゲル化可能な溶液条件を付与できるものであればよい。ゲル化溶液の組成は、コラーゲン溶液側のコラーゲン濃度、イオン強度、pH、緩衝性等を考慮して、その組成が設定され、また、どのような状態でゲル化したいかに応じて適宜設定される。好ましくはpHは、6~9に設定される。

【0015】平衡化を経ることによってコラーゲンゲルを形成するには、ゲル化溶液は、中性域のpHを備えていることが好ましい。また、中性塩類溶液であることがより好ましい。コラーゲン溶液中の本溶質組成を、中性塩類溶液により、中性塩類溶液に平衡化してゲル化すると、中性塩類条件下あるいはそれに近似された条件下でゲル化されたコラーゲンゲルが得られる。本発明において使用する中性塩類溶液とは、中性域のpHを有する塩類溶液である。このような中性塩類溶液としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム等の各種塩類の溶液を挙げることができる。好ましくは、中性塩類溶液は、pHの緩衝能を有している。

【0016】ゲル化溶液は、生理的塩類溶液であることがより好ましい。コラーゲン溶液の本溶質組成を、生理的塩類溶液で生理的塩類溶液に平衡化しながらゲル化すると、生理的塩類条件下あるいはそれに近似された条件

下でゲル化されたコラーゲンゲルが得られる。かかるコラーゲンゲルは、生理的塩類溶液等、細胞の生存を維持させるように調製された媒体や生体と接触しても、その収縮が抑制される。

【0017】本発明において使用する生理的塩類溶液とは、細胞の生存に適したpHと浸透圧を備えた塩類溶液である。このような生理的塩類溶液としては、生理食塩液(0.9%NaCl水溶液)、さらには生理食塩液に K^+ 、 Ca^{2+} 等細胞液中の主要なイオンを数種加えた組成の塩類溶液を挙げることができる。また、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} のイオンの平衡を保つように調合され、あるいはさらに、pHを安定に維持するように緩衝系を加えた塩類溶液である平衡塩類溶液を挙げることができる。また、各種細胞培養液を挙げることができる。

【0018】かかる生理的塩類溶液としては、リンガー液、リンガーロック液、タイロッド液、アール液、ハanks液、ロック液、Morgan、Morton、及びParkerの合成培養液No.199、Evansらの合成培養液NCTC109、Parkerらの合成培養液CMRL-1066、McCoyらの5a培養液、Eagleの最小必須培養液、Dulbeccoの改変Eagle培養液、LeibovitzのL-15培養液、Hamの合成培養液F12、MoorのRPMI-1640培養液、Williamsらの培養液E、KatsutaらSFM-101の培養液のDM-i60培養液、YamaneらのRITC80-7培養液、無血清培養液ASF104(RITC62-8) Graceの昆虫細胞の合成培養液、Schneiderの培養液、Mitsuhashi-Maramoroshの培養液、Knop液、Gautheretの培養液等を挙げることができる。なお、本発明では、上記した生理的塩類溶液でなくても、上記した生理的塩類溶液に準ずる電解質溶液も、生理的塩類溶液と同等に好ましく用いることができる。

【0019】(平衡化) ゲル化溶液による平衡化は、本半透膜で行うことが好ましい。本半透膜は、所望の平衡化速度が得られるように適宜選択される。コラーゲンとともに他の高分子も用いて複合化したコラーゲンゲルを作製しようとする場合には、当該他の高分子も通さないような半透膜を、本半透膜として用いることが好ましい。この場合、本半透膜は、使用するコラーゲンの分子量の他、他の高分子の分子量も考慮して適宜選択される。

【0020】平衡化は、コラーゲンゲル膜でも好ましく行われる。コラーゲンゲル膜によっても、本半透膜と同等の半透性を得ることができる。コラーゲンゲル膜による平衡化は、通常、コラーゲン酸性溶液の表面のみをゲル化してコラーゲンゲル膜を形成し、このコラーゲンゲル膜を介して、膜の内側にあるコラーゲン酸性溶液とコラーゲンゲル膜の外側のゲル化溶液とを接触させることにより行われる。かかるコラーゲンゲル膜は、コラーゲン酸性溶液の表面を短時間アンモニア雰囲気曝すことにより得ることができる。コラーゲンゲル膜によると、高価な半透膜を使用する必要がない、という利点があ

る。なお、この際、コラーゲンゲル膜の厚みは特に限定はなく、所望の平衡化速度が得られるように適宜選択される。また、ゲル構成分子としてのコラーゲンの分子量、あるいはその他の高分子の分子量も考慮して選択される。

【0021】このように、本半透膜あるいはコラーゲンゲル膜を介してゲル化溶液と接触させることにより平衡化すると、コラーゲン溶液のコラーゲン濃度がほぼ維持されてコラーゲンがゲル化可能な状態となる。したがって、所望のコラーゲン濃度のゲルを得ることができる。特に、高濃度のコラーゲン濃度のゲルを得ることができる。また、平衡化における温度は、コラーゲンが変性しない温度であればよい。コラーゲンの線維化は、加温（一般的には37℃程度までである。）すると加速されることが知られている。したがって、平衡化に際しては、コラーゲンが変性しないか、あるいは、コラーゲンのゲル化に障害が生じない範囲で、コラーゲン溶液及びゲル化溶液を含む系を25～37℃の範囲で加温することができる。ただし、本溶質組成が所望のゲル化条件にまで到達するまでは、コラーゲンの変性をできるだけ避けるために25℃未満に保持し、平衡化により所望のゲル化条件が得られた段階で25～37℃に加温することが好ましい。

【0022】なお、コラーゲン溶液として、中性コラーゲン溶液を用いる場合には、ゲル化しやすいため、できるだけ低温で平衡化を行う。また、平衡化あるいはゲル化に際して、イオン強度やpH、温度、コラーゲン濃度、半透膜の性質、コラーゲンゲル膜の厚み等を調整することにより、平衡化時間、ゲル化までの時間、ゲルの強度、ゲルの性質等を調整することができる。イオン強度やpH等は、主としてゲル化溶液において調整される。コラーゲン濃度は、コラーゲン溶液において調整される。

【0023】得られたコラーゲンゲルは、そのままゲル状のコラーゲン成形体として各種用途に使用できる。また、このゲル状成形体の形態は、フィルム状、棒状、球状、紡錘状、円筒状等、成形体の用途に応じて選択することができる。さらに、このゲル状コラーゲン成形体を乾燥したり凍結乾燥したりして、乾燥成形体やスポンジ状成形体等のコラーゲン成形体とすることができる。これらの各種成形体においては、紫外線照射やガンマー線照射による架橋や、化学試薬による架橋が可能である。

【0024】コラーゲンゲルが中性あるいはそれに近似された条件下でゲル化されていれば、中性条件下に予め順応したコラーゲンゲルあるいはコラーゲン成形体を得られる。コラーゲンゲルが生理的条件あるいはそれに近似された条件下でゲル化されている場合には、生理的条件下に予め順応したコラーゲンゲルあるいはコラーゲン成形体を得られる。

【0025】本発明方法によって得られた各種のコラー

ゲン成形体を、生理的塩類溶液に浸漬した場合、初期状態における成形体の面積（初期面積）と、生理的塩類溶液浸漬後に成形体の面積の変化がほぼなくなった状態における成形体の面積（平衡面積）とを測定し、初期面積に対する平衡面積の割合（％）を、コラーゲン成形体の面積保持率とすると、本発明のコラーゲン成形体は、80％以上の面積保持率を有し、好ましくは、85％以上、より好ましくは90％以上の面積保持率を有する。初期面積は、コラーゲンゲルについては、生理的塩類浸漬前の成形体の面積であり、コラーゲンゲルを乾燥して得たコラーゲン成形体の初期面積は、生理的塩類溶液浸漬前のコラーゲン成形体が吸水していない乾燥状態の面積をいうものとする。なお、面積保持率の算出に際しての初期面積及び平衡面積は、コラーゲン成形体の全体の面積の他、互いに対応付け可能な一部分の面積とすることもできる。

【0026】これらの各種成形体は、従来どおり、各種用途に使用される。特に、細胞、組織、器官あるいは臓器を培養する培養基材、創傷被覆材、止血材、コンタクトレンズ、人工角膜、角膜バンテージ材、各種移植材料、各種組織再生材料、人工弁、DDS (Drug Delivery System) 用材料、として使用される。好ましくは、培養皮膚基材として用いられ、真皮細胞あるいは表皮細胞が培養された本発明のコラーゲン成形体は培養皮膚として用いられる。

【0027】特に、生理的塩類溶液に平衡化してゲル化することを経て得られるコラーゲン成形体を、細胞等の培養基材として用いた場合において、生理的塩類溶液中で培養中の基材の収縮が抑制される。皮膚細胞を培養する基材として使用して培養皮膚を形成する場合においても、生理的塩類溶液中で培養中の基材の収縮や培養皮膚として適用した際の収縮が抑制される。また、熱傷、創傷、褥瘡あるいは皮膚潰瘍等の創傷被覆材に用いた場合に、使用中の創傷被覆材の収縮が抑制される。

【0028】

【発明の効果】本発明によると、コラーゲン溶液をコラーゲン溶液中のコラーゲン以外の溶質組成をコラーゲンがゲル化可能な状態に平衡化してコラーゲンをゲル化するため、従来にない条件下でゲル化されたコラーゲン成形体が提供される。

【0029】

【実施例】以下、本発明について、実施例をあげて具体的に説明する。なお、本発明は、これらの実施例に限定されるものでは決していない。

（実施例1）本半透膜を利用したアテロコラーゲンゲルの作製

本実施例では、1w/v %のアテロコラーゲン塩酸性溶液50mlを、ゲル化しない状態に保持しながら、スペクトラム社の半透膜（再生セルロース製チューブ：平面幅100mm、長さ約200mm、分画分子量6000～

8000)に封入し、全体に約120メッシュサイズの孔部を備えた金属製枠で、上記チューブが、約5mm×約90mm×約200mmのほぼ直方体となるように固定した。このコラーゲン溶液の封入された半透膜チューブを、2Lのリン酸緩衝液(1リットル中に、塩化ナトリウム8000mg、塩化カリウム200mg、リン酸一水素ナトリウム1150mg、リン酸二水素カリウム200mgを含有する。)に浸漬し、37℃、約72時間ゲル化を行った。この結果、白色のアテロコラーゲンゲルを得た。

【0030】このゲルを半透膜チューブから離型し、直径51mmの円板状に切り出し、その全体を前記リン酸緩衝液に7日間浸漬した。このゲルにおける浸漬前の底面積(初期面積)に対する7日間浸漬後の底面積(平衡面積)の割合は、100%であった。

【0031】(実施例2)本半透膜を利用したアテロコラーゲンスポンジ状体の作製
実施例1と同様の方法でゲル化したアテロコラーゲンゲルを凍結乾燥し、アテロコラーゲンスポンジを得た。得られたスポンジ状体を離型し、前記リン酸緩衝液に8日間浸漬した。このスポンジ状体における浸漬前の底面積(初期面積)に対する8日間浸漬後の底面積(平衡面積)の割合は、95%であった。

【0032】(実施例3)表面を予備的にゲル化し、その後ゲル化溶液で平衡化することによるアテロコラーゲンゲルの作製
ポリスチレンケース(内寸95mm×60mm×10mm)に1w/v%のアテロコラーゲン塩酸酸性溶液15mlを入れ、アンモニア雰囲気(アンモニアガス)に6分間静置して、表面のみをゲル化した。次いで、このケースの全体を2Lの前記リン酸緩衝液に浸漬し、37℃で約24時間ゲル化を行った。この結果、白色のアテロコラーゲンゲルを得た。得られたゲルを離型し、前記リン酸緩衝液に11日間浸漬した。このゲルにおける浸漬前の底面積(95mm×60mmの部分、初期面積)に対する11日間浸漬後の底面積(平衡面積)の割合は97%であった。

【0033】(実施例4)表面を予備的にゲル化し、その後ゲル化溶液で平衡化することによるアテロコラーゲンスポンジ状体の作製
ポリスチレンケース(内寸95mm×60mm×10mm)に1w/v%のアテロコラーゲン塩酸酸性溶液15ml

を入れ、アンモニア雰囲気(アンモニアガス)に3分間静置して、表面のみをゲル化した。次いで、このケースの全体を2Lの前記リン酸緩衝液に浸漬し、37℃で約19時間ゲル化を行った。この結果、白色のアテロコラーゲンゲルを得た。このゲルを凍結乾燥し、アテロコラーゲンスポンジ状体を得た。得られたアテロコラーゲンスポンジ状体を離型し、紫外線を照射して架橋した。

【0034】このアテロコラーゲンスポンジ状体の全体を、10v/v%ウシ胎児血清(FCS)を含むダルベッコ変法イーグル最小必須培地(DMEM)(以下、DMEM(FCS)という。)30mlに2日間浸漬した。このスポンジ状体において、浸漬前の底面積(ゲル時に95mm×60mmに対応する部分、初期面積)に対する2日間浸漬後の底面積(平衡面積)の割合は100%であった。

【0035】(比較例1)アンモニアガスを利用したアテロコラーゲンゲルの作製
ポリスチレンケース(内寸95mm×60mm×10mm)に1w/v%のアテロコラーゲン塩酸酸性溶液15mlを入れ、アンモニア雰囲気(アンモニアガス)に2時間静置してゲル化して白色のアテロコラーゲンゲルを得た。次いで、このゲルを水洗した後離型し、その全体を2Lの前記リン酸緩衝液に10日間浸漬した。このゲルにおいて、浸漬前の底面積(95mm×60mmの部分、初期面積)に対する10日間浸漬後の底面積(平衡面積)の割合は67%であった。

【0036】(比較例2)アンモニアガスを利用したアテロコラーゲンスポンジ状体の作製
ポリスチレンケース(内寸95mm×60mm×10mm)に1w/v%のアテロコラーゲン塩酸酸性溶液15mlを入れ、アンモニア雰囲気(アンモニアガス)に2時間静置してゲル化して白色のアテロコラーゲンゲルを得た。次いで、このゲルを水洗した後、ゲルを凍結乾燥し、アテロコラーゲンスポンジ状体を得た。得られたスポンジ状体を離型し、その全体をDMEM(FCS)に2日間浸漬した。このスポンジ状体において、浸漬前の底面積(ゲル時に95mm×60mmに対応する部分、初期面積)に対する2日間浸漬後の底面積(平衡面積)の割合は76%であった。